

Desenvolvimento de uma cultura celular organotípica para triagem de medicamentos

Development of an organotypic cell culture for drug screening

DOI:10.34119/bjhrv3n6-316

Recebimento dos originais: 22/11/2020

Aceitação para publicação: 22/12/2020

Leonardo Francisco Diel

Graduado em Odontologia
UFRGS

Rua Ramiro Barcelos, 2492, Floresta, Porto Alegre, RS, CEP 90035-003

Bibiana Franzen Matte

Doutora em Patologia Bucal
UFRGS

Rua Ramiro Barcelos, 2492, Floresta, Porto Alegre, RS, CEP 90035-003

E-mail: bfmatte@gmail.com

Franciele Pinto Ribeiro

Graduanda em Odontologia
UFRGS

Rua Ramiro Barcelos, 2492, Floresta, Porto Alegre, RS, CEP 90035-003

Luiza Meurer Brand

Graduanda em Odontologia
UFRGS

Rua Ramiro Barcelos, 2492, Floresta, Porto Alegre, RS, CEP 90035-003

Lisiane Bernardi

Doutora em Clínica Odontológica
UFRGS

Rua Ramiro Barcelos, 2492, Floresta, Porto Alegre, RS, CEP 90035-003

Marcelo Lazzaron Lamers

Doutor em Biologia Celular e Molecular
UFRGS

Rua Ramiro Barcelos, 2492, Floresta, Porto Alegre, RS, CEP 90035-003

RESUMO

O desenvolvimento de novas terapias é importante para todos os campos das ciências da saúde. No entanto, os testes de drogas são geralmente realizados em cultura de células em monocamada, que não representam os mesmos efeitos citotóxicos observados em vivo. O objetivo deste estudo é desenvolver uma cultura celular organotípica de câncer bucal utilizando diferentes linhagens celulares. Foi utilizado o colágeno extraído de caudas de ratos para produzir a matriz extracelular. Em seguida, fibroblastos primários foram adicionados à matriz extracelular. Sobre a matriz, diferentes linhagens celulares com origem epitelial foram usadas para comparar o comportamento invasivo tumoral. Foram utilizadas linhagens celular de queratinócitos (HaCat), de câncer de boca

muito (Cal27) ou pouco (SCC-9) diferenciado. As linhagens HaCat e Cal27 formaram um epitélio desorganizado com múltiplas camadas celulares. A estratificação não acompanhou a estratificação vista no epitélio humano. Somente na linhagem agressiva de câncer bucal (SCC9) observou-se invasão no tecido adjacente, a qual se assemelhava à arquitetura do câncer bucal. Com esta estratégia, foi obtido um modelo in vitro de epitélio estratificado e de câncer oral, os quais poderiam servir para a triagem de drogas.

Palavras-chave: Cultura Celular, Câncer oral, Queratinócitos.

ABSTRACT

The development of new therapies is important for all fields of health sciences. However, drug tests are usually performed on monolayer cell cultures, which do not represent the same cytotoxic effects observed in vivo. The objective of this study is to develop an organotypic cell culture of oral cancer using different cell lines. Collagen extracted from rat tails was used to produce the extracellular matrix. Subsequently, primary fibroblasts were added to the extracellular matrix. On the matrix, different cell lines with epithelial origin were used to compare the tumor invasive behavior. Cell lines of keratinocytes (HaCat), of very (Cal27) or little (SCC-9) differentiated oral cancer were used. The HaCat and Cal27 strains formed a disorganized epithelium with multiple cell layers. The stratification did not follow the stratification seen in human epithelium. Only in the aggressive lineage of oral cancer (SCC9) invasion was observed in the adjacent tissue, which resembled the architecture of oral cancer. With this strategy, an in vitro model of stratified epithelium and oral cancer was obtained, which could be used for drug screening.

Keywords: Cultura Celular, Câncer oral, Queratinócitos.

1 INTRODUÇÃO

As pesquisas biológicas realizadas em laboratório baseiam-se no uso de modelos que buscam mimetizar e replicar estruturas observadas em organismos vivos. Por exemplo, o estudo de desenvolvimento de novas drogas inicia com análises realizadas em linhagens celulares. As culturas celulares mais utilizadas, no entanto, ainda são realizadas com as células presentes em dispositivos plásticos que não conseguem reproduzir o ambiente em que estas células originalmente estavam em organismos vivos. Células aderidas ao plástico representam um cultivo celular bidimensional (2D) e não há demais componentes da matriz extracelular como observado nos tecidos e órgãos. Consequentemente, muitos estudos demonstram resultados falso-positivos, como drogas que, apesar de terem ação em linhagens celulares, demonstram falhas nos estudos in vivo. O estudo em seres vivos, como modelos animais e ensaios clínicos, possuem também problemas particulares como o seu alto custo biológico, ético e financeiro. Portanto, o uso de engenharia tecidual tem sido uma alternativa ao cultivo celular bidimensional e aos modelos in vivo ao utilizar materiais biomiméticos e linhagens celulares para mimetizar tecidos em um ambiente tridimensional (3D) (Colley et al., 2011).

A utilização de modelos de cultivo celular tridimensional demonstra vantagens para o estudo da arquitetura, comportamento e comunicação das células. Estes modelos podem ser utilizados para o estudo desde tecidos e órgãos sadios assim como para mimetizar e estudar diferentes patologias. O câncer é uma doença que vem sendo amplamente estudada com modelos tridimensionais para que possamos compreender melhor sobre como as células neoplásicas interagem e como podemos modular seu comportamento. O carcinoma espinocelular oral, por exemplo, é caracterizado por células epiteliais neoplásicas que invadem o tecido conjuntivo subjacente e possuem alterações genéticas (Neville, 2009). Estas observações realizadas durante o diagnóstico histopatológico podem ser replicadas em modelo laboratorial tridimensional para que o estudo desta doença seja aprofundado. Além disso, este tipo de modelo também pode prever a eficácia de novas drogas com melhor precisão se comparado com modelos bidimensionais.

Portanto, o objetivo deste estudo é desenvolver um modelo tridimensional para estudar o câncer de boca a partir do uso de um biomaterial e analisar o comportamento de diferentes linhagens celulares neste ambiente.

2 METODOLOGIA

2.1 CULTURA DE CÉLULAS

A linhagem celular de queratinócitos humanos HaCat e as linhagens celulares de carcinoma espinocelular oral Cal27 e SCC9 foram utilizadas neste estudo. Fibroblastos primários foram cultivados a partir da doação de fragmento de mucosa oral. As linhagens HaCat, Cal27 e SCC9 foram mantidas com o meio de cultura DMEM com alto teor de glicose, adição de soro fetal bovino (10%) e penicilina e estreptomicina (1%). Os fibroblastos primários foram cultivados com o meio de cultura DMEM com baixo teor de glicose, adição de soro fetal bovino (10%) e penicilina e estreptomicina (1%). Todas as células são mantidas em estufa (37°C, 5% CO₂).

2.2 EXTRAÇÃO DE COLÁGENO TIPO I A PARTIR DA CAUDA DE RATO

O colágeno tipo I foi extraído de cauda de rato como descrito previamente na literatura (Timpson et al, 2011). Inicialmente, a cauda de rato foi incisada ao longo eixo para remover a pele. Ao identificar os tendões, removeu-se cada um deles e foram colocados em solução de ácido acético 0,5M. Após 48 horas de agitação em ácido acético, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante coletado. Este sobrenadante foi dissolvido na mesma quantidade de solução de 10% de cloreto de sódio por 1 hora. Esta mistura foi centrifugada, o pellet formado coletado e

adicionou-se ácido acético 0.25M em agitação por mais 24 horas. Esta solução passou por 4 dias de diálise e então foi liofilizado. O colágeno liofilizado foi diluído na concentração de 3mg/ml em ácido acético 0,25mM para posterior utilização na produção da matriz de gel de colágeno.

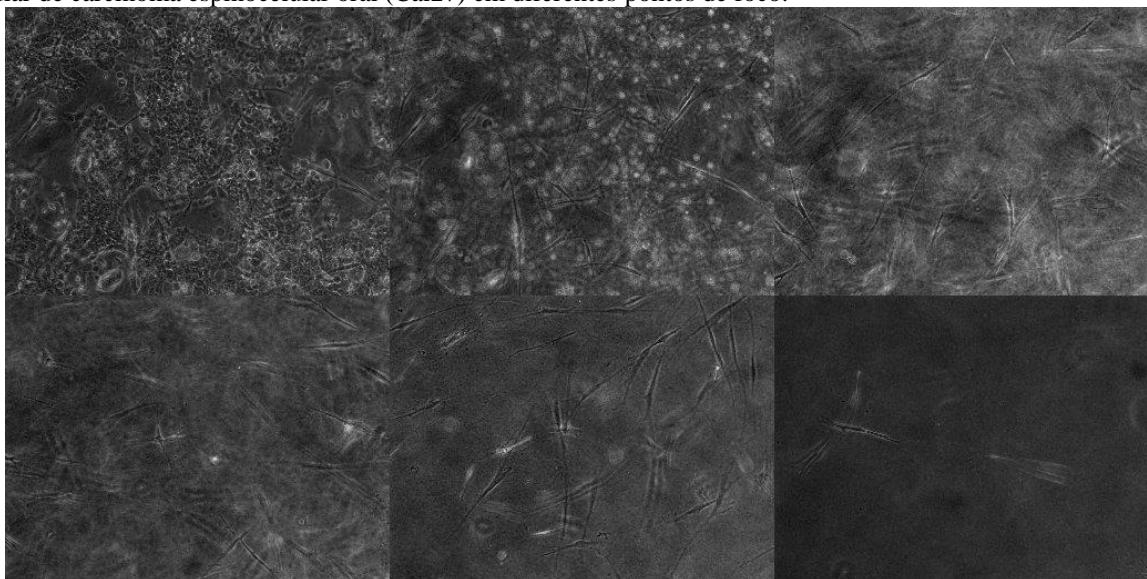
2.3 PRODUÇÃO DE MATRIZ TRIDIMENSIONAL DE CULTURA CELULAR

A confecção da matriz ocorreu através da mistura do colágeno 3mg/ml, DMEM 5x concentrado, 0,1M de NaOH e DMEM 1x concentrado onde obtivemos um gel de colágeno de concentração final de 1,8mg/ml. Uma segunda camada foi realizada através da mistura destes mesmos componentes com a adição de 8×10^4 fibroblastos de mucosa oral por well e adição de meio de cultura. Após dois dias, células não-tumorais e tumorais de carcinoma espinocelular oral foram adicionadas na superfície da matriz. Seguidos dois dias, a matriz foi erguida em um suporte para permitir a formação de uma interface ar-líquido e, assim, permitir a estratificação e invasão destas células. Após 14 dias, a matriz seguiu o processo de fixação com paraformaldeído 4% tamponado, processamento histotécnico, inclusão em parafina, corte no micrótomo e coloração por hematoxilina e ensina.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a confecção do gel de colágeno com adição de fibroblastos e células epiteliais, constatou-se a formação da cultura celular tridimensional. Em microscópio invertido de fase, observou-se a presença de fibroblastos em diferentes planos de foco e a presença de células epiteliais na superfície (Figura 1). Assim, ocorreu a formação de uma cultura tridimensional em que as células estão embebidas pela matriz e em contato com um ambiente que se assemelha aos tecidos vivos.

Figura 1: Fotos de gel de colágeno tipo I, em microscopia invertida de fase, com a presença de fibroblastos e linhagem celular de carcinoma espinocelular oral (Cal27) em diferentes pontos de foco.



Com a formação da interface ar-líquido e cultivo por 14 dias nestas condições, prosseguiu-se com a fixação, processamento histológico, corte e coloração para observar as estruturas formadas pelos diferentes tipos celulares. Observou-se que a linhagem celular de queratinócitos humanos formou um epitélio com diferentes camadas, porém estas estão desorganizadas. Percebe-se que a utilização de linhagens celulares imortalizadas ainda é um desafio quando buscamos mimetizar tecidos vivos uma vez que estas células já possuem alterações fenotípicas e, por isso, falham ao realizar a estratificação epitelial similar ao que observamos in vivo. Em busca de melhorar a estratificação epitelial, pode-se utilizar queratinócitos de cultura primária.

Em relação as células de carcinoma espinocelular oral, observamos uma diferença entre as duas linhagens testadas. A linhagem celular Cal27 apresentou menor potencial de invasão - como evidenciado em trabalhos anteriores e este comportamento se traduziu na matriz de colágeno 3D. As células desta linhagem realizaram a formação de camadas semelhantes a um epitélio estratificado, mas também apresentando certa desorganização estrutural. Esta desorganização observada é semelhante ao que vemos em espécimes humanas de displasia epitelial oral. Já a linhagem tumoral SCC9 que possui comportamento mais agressivo realizou invasão na matriz de colágeno, após o cultivo em interface ar-líquido, mimetizando o comportamento de células neoplásicas in vivo com a invasão no tecido conjuntivo adjacente.

Portanto, este estudo demonstra a interação de diferentes células com gel de colágeno tipo I – que é um importante componente da matriz extracelular - para a formação de um modelo tridimensional de pele e câncer de boca. Neste modelo, observamos a formação de diferentes tecidos, desde um epitélio estratificado até o carcinoma espinocelular oral. Com este modelo

estabelecido, será possível aprofundar o estudo do comportamento de células tumorais assim como o teste de potenciais agente antitumorais.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Laboratório de Migração Celular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (www.ufrgs.br/lamoc) para o desenvolvimento da pesquisa e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Auxílio à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pelos auxílios financeiros.

REFERÊNCIAS

Colley, H. E. et al (2011), Development of tissue-engineered models of oral dysplasia and early invasive oral squamous cell carcinoma, *Br J Cancer*, vol.105, 1582-1592.

Neville, B. (2009), *Patologia Oral e Maxilofacial*, 3º Ed., Elsevier, Rio de Janeiro.

Timpson, P. et al (2011). Organotypic collagen I assay: a malleable platform to assess cell behaviour in a 3-dimensional context, *Journal of Visualized Experiments*, vol. 56.